

人源分泌型血管内皮细胞生长因子受体 flt-1(I~ IV区)的基因克隆及其腺病毒载体的构建和表达*

张 华 寿成超**

(北京大学临床肿瘤学院, 北京市肿瘤防治研究所, 北京 100034)

摘要 肿瘤的生长、转移与血管形成密切相关, 利用基因治疗的方法将抗血管形成的因子导入体内是目前肿瘤生物治疗研究的重要策略。血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 在血管生成中起重要作用, 因此阻断 VEGF 与相应受体的结合成为抗血管形成的重要靶点。通过 RT-PCR 从人脐静脉内皮细胞克隆了 VEGF 受体 Flt-1 的信号肽及胞外 I ~ IV 区 cDNA, 即可溶性 sFlt-1 的 cDNA 片段。利用 Ad-Easy 体系, 在细菌 BJ5183 中同源重组后, 转染包装细胞 293, 成功包装出重组 flt-1 腺病毒, 利用它可有效地感染低分化胃黏液腺癌细胞株 MGC803。经 RT-PCR, 免疫沉淀及免疫印迹等不同方法检测表明, 被感染细胞能表达并分泌 Flt-1 的胞外区蛋白, 为后续进行抗肿瘤血管形成的基因治疗研究奠定了基础。

关键词 腺病毒, flt-1, 同源重组, 表达

学科分类号 Q78

肿瘤的生长与转移有赖于新生血管的形成, 而后者发生取决于肿瘤局部促血管形成因子与抑制血管形成因子之间的平衡状态。肿瘤细胞可分泌大量的血管内皮细胞生长因子 (VEGF), 通过作用于内皮细胞相应的受体引起内皮细胞的增殖及血管的形成。Flt-1 (VEGFR1) 是 VEGF 的高亲和力受体, K_d 为 $1.6 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$ ^[1]。有研究表明^[2,3], 体内有可溶性 Flt-1 受体 (sFlt-1) 存在, 它只含有胞外的 I ~ IV 区, 能与膜表面受体 Flt-1 竞争结合 VEGF, 并且能与膜表面受体 Flt-1 及 KDR (kinase insert domain containing receptor) 形成同源或异源二聚体, 从而阻断 VEGF 的生物学活性, 因此 sFlt-1 可能是体内天然的针对 VEGF 的负反馈分子。目前国外已有利用 sFlt-1 进行抑瘤研究的报道, 且收效较为显著。由于 sFlt-1 同 VEGF 有较高的亲和力, 又无异源性问题, 因此选用 sFlt-1 作为 VEGF 阻断剂有其独到之处。为了用 sFlt-1 进行肿瘤的基因治疗, 我们克隆了含有信号肽和与 VEGF 结合相关的 Ig 样 I ~ IV 区的 cDNA 片段, 构建了人源 sflt-1 的腺病毒表达载体, 并证明了其在肿瘤细胞内的成功表达与分泌。

1 材料与方法

1.1 材料

293 包装细胞由人民医院何湘君老师惠赠, 10% 胎牛血清 DMEM 培养; 胃癌细胞 MGC803 由本室保存, 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养。

BJ5183 菌株, 穿梭质粒 pAdTrack-CMV, 腺病毒基因组质粒 pAdEasy-1 由北京市肿瘤防治研究所张志谦老师惠赠。pcDNA3-EF-1 质粒由本室构建; 限制性内切酶, T4 DNA 连接酶为 New England BioLab 产品, TRIZOL 试剂盒, 逆转录试剂盒, lipofectamine, Opti-MEM, DMEM, RPMI-1640 培养基及 II 型胶原酶为 Gibco 公司产品。Flt-1 多抗为 Santa Cruze 公司产品。抗谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 单抗由本室制备。

1.2 方法

1.2.1 人脐带内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 的分离。收集出生 6 h 以内的新生儿脐带, PBS 反复冲洗脐静脉, 直至流出的液体为无色, 注入 0.125% 的 II 型胶原酶, 并结扎脐带两端, 于 37℃ 水浴作用 10~15 min, 吸出消化液, 加入 1~2 ml 胎牛血清中止反应, 并用 PBS 冲洗管腔, 消化液连同冲洗液收集至 50 ml 离心管, 1 000 r/min 离心 10 min, 细胞沉淀用 PBS 悬浮, 细胞计数。

1.2.2 从 HUVEC 中扩增 flt-1 的信号肽及胞外 I ~ IV 区。根据 flt-1 的 cDNA 序列, 设计并合成相应的一对特异引物, 上游引物中引入核酸内切酶 Not I 位点及 Kozak 序列 (上游引物 5'-ATA

* 国家杰出青年科学基金 (39525021), 北京市科委和北京市高技术实验室资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-66160960, E-mail: cshou9@hotmail.com

收稿日期: 2002-01-17, 接受日期: 2002-03-28

AGC GGC CGC CAC CAT GGT CAG CTA GGA C-3', 对应于该 cDNA 序列 1~15 bp 处), 下游引物中引入核酸内切酶 *Xba* I 位点及终止密码子 (下游引物 5'-GGC TCT AGA TTA CTG GGG TTT CAC ATT GAG-3', 对应于该 cDNA 序列 1270~1287 bp 处)。

按 TRIZOL 试剂盒说明书, 从 2.5×10^6 HUVEC 中提取总 RNA, 利用逆转录试剂盒以 *flt-1* 下游引物进行逆转录, 以获得的 cDNA 为模板, 用上述配对引物经 PCR 扩增目的条带, 反应条件为 100 μ l 体系加入 2 μ l cDNA 模板, 5U Vent DNA 聚合酶, 镁离子浓度为 2 mmol/L, 95℃变性 5 min 后, 94℃变性 45 s, 67℃退火 1 min, 72℃延伸 3 min, 扩增 35 个循环, 然后 72℃延伸 10 min。

1.2.3 目的片段的克隆与鉴定. RT-PCR 产物以 *Not* I 和 *Xba* I 位点克隆入 pcDNA3-EF-1 载体, 酶切鉴定后的阳性克隆进行测序。

1.2.4 重组腺病毒 Ad-EF-1-*flt-1* 及 AdTrack 的产生 (图 1). RT-PCR 产物以 *Not* I 和 *Xba* I 位点重组入 pcDNA3-EF-1, 继而后用 *Hind* III 和 *Xba* I 分别双酶切克隆得到的 pcDNA3-EF-1-*flt-1* 和穿梭质粒 pAdTrack-CMV, 回收产物继而连接, 获得带有 GFP 基因的穿梭质粒 pAdTrack-CMV-EF-1-*flt-1*。

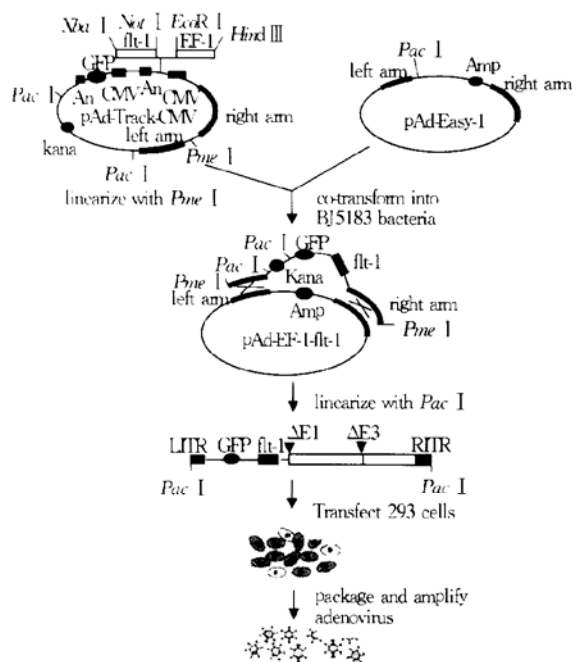


Fig. 1 Strategy for construction of recombinant adenoviral vector Ad-EF1-*flt-1*

将 200 ng 经 *Pme* I 线性化并经纯化的

pAdTrack-CMV-EF-1-*flt-1* 与 100 ng PEG 纯化的 pAdEasy-1 共同电转化细菌 BJ5183, 获得同源重组子 Ad-EF-1-*flt-1*, 将其转入 DH10B 中, 大量扩增并用 PEG 纯化. 利用 20 μ l lipofectamin 与 5 μ g 经 *Pac* I 线性化的 Ad-EF-1-*flt-1* 转染一瓶 50%~70% 汇合的 293 病毒包装细胞 (3×10^6), 转染 5 h 后去掉转染液, 加入 6 ml 10% DMEM 继续培养, 24 h 后在倒置荧光显微镜下可见绿色荧光蛋白 (GFP) 表达的阳性细胞, 转染效率约 10%, 转染 7~10 d 后, 离心收集细胞, 培养上清在 -20℃ 冻存, 细胞沉淀用 1 ml 培养上清悬浮, 于液氮/37℃ 水浴中反复冻融 4 次, 12 000 r/min 离心 10 min, 上清即为收获的病毒液, 于 -70℃ 冻存. 同样的方法制备阴性对照的腺病毒 AdTrack.

1.2.5 重组腺病毒 Ad-EF-1-*flt-1* 的鉴定. 对培养上清和细胞裂解液用 PCR 的方法检测 Ad-EF-1-*flt-1*, 方法如下: 将 10 μ l 培养上清或 5 μ l 病毒液与 1 μ l 蛋白酶 K (20 g/L) 在 55℃ 作用 2 h, 煮沸 5 min, 离心后取 2.5 μ l 上清作为模板, 用 PCR 扩增 *sflt-1* cDNA, PCR 条件同前。

1.2.6 腺病毒滴度的检测. 293 细胞以 10^6 个/孔铺 6 孔板, 培养至汇合度为 80%~90%, 10 倍系列稀释病毒液, 10^{-3} ~ 10^{-8} (或以上), 每孔 1 ml, 37℃ 感染 3~6 h, 添加 5% DMEM 至 2 ml/孔, 继续培养 18 h 后, 在荧光显微镜下计数绿色荧光蛋白 (GFP) 阳性的细胞数, 乘以稀释倍数, 即为病毒滴度 (pfu/ml)。

1.2.7 腺病毒的扩增. 收获病毒液, 以感染复数 (multiplicity of infection, *MOI*) 为 2 的稀释液感染 90% 汇合度的 293 细胞, 病毒液用 5% DMEM 稀释, 体积为刚刚覆盖细胞层, 37℃ 感染 2 h 后, 添加 5% DMEM, 继续培养 48~72 h, 用上述方法裂解细胞, 收集上清. 从 3×10^8 细胞中收获病毒颗粒 2.5×10^{10} pfu。

1.2.8 检验腺病毒对 MGC803 细胞的感染能力 (*MOI* 试验). MGC803 细胞铺 24 孔板, 约 80%~90% 汇合时, 以 *MOI* 分别为 1, 10, 100 的病毒液, 37℃ 感染 3 h, 继续培养 20 h, 在荧光显微镜下观察感染情况. 当 *MOI* = 10 时, 可 100% 感染 MGC803 细胞, 在以后的实验中均以 *MOI* = 50 进行感染。

1.2.9 RT-PCR 检测转染了 Ad-EF-1-*flt-1* 的 MGC803 细胞中目的基因转录. 分别以 Ad-EF-1-*flt-1* 和 AdTrack (*MOI* = 50) 感染 80%~90% 汇

合的 MGC803 细胞, 37℃ 感染 3 h 后用 PBS 洗 3 遍, 添加无血清 1640 继续培养 72 h, 收集细胞, 离心, 上清即为条件培养基, 细胞沉淀用 TRIZOL 试剂盒提取 RNA, Ad-*EF-1-flt-1* 用无 RNase 的 DNaseI 处理, 37℃ 10 min, 然后 70℃ 15 min 灭活, 用处理后的 RNA 进行逆转录, 取 2 μl cDNA 为模板, 用前述特异性引物 PCR 扩增 *flt-1* cDNA 片段, 并以 2 μl 处理后的 RNA 直接进行 PCR 和 2 μl Ad-Track 的 cDNA 进行 PCR 作为阴性对照。

1.2.10 目的蛋白的表达检测. 用上述同样的方法转染细胞后, 细胞沉淀用 PBS 洗一遍, 悬浮于 100 μl PBS, 加 25 μl 5×SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 上样缓冲液裂解细胞, 煮沸 5 min, 离心后取 20 μl 上清上样, 条件培养基 24 μl 再加 6 μl 5×SDS-PAGE 上样缓冲液, 煮沸后全部上样. 阴性对照组 Ad-Track 同样处理. 经 10% SDS-PAGE 后用抗 Flt-1 抗体进行蛋白质印迹 (Western blot) 检测。

1.2.11 培养上清中分泌蛋白的检测. 在上述蛋白质印迹结果中, 细胞裂解液里可检测到目的蛋白的表达, 大小为 55 ku 左右, 但是直接用培养上清进行蛋白质印迹未见明显条带. 由于抗体重链的分子质量为 55 ku, 如对上清进行免疫沉淀后再用相同的抗体进行蛋白质印迹检测时, 酶标二抗也会和免疫沉淀时所用的抗体重链发生反应, 影响对结果的观察. 为证实目的蛋白可分泌至细胞外, 构建融合蛋白 Flt-谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 的腺病毒载体, 构建方法如下: 利用上述 *flt-1* 上游引物, 和重新合成的下游引物 (不含终止密码子, 引入 *EcoRI* 位点: GGCGAATTCTGGGGTTTCACATTGAC) 扩增含信号肽的 *flt-1* 胞外 I~IV 区, 利用 GST 引物 (上游引物引入 *EcoRI* 位点: CCAGAATTCGATGTCCCCTAT - ACTAG, 下游引物引入 *XbaI* 位点和终止密码子: GCTCTAGATCAGTCACGATGGATTCC) 从 pGEX-2T 中扩增 GST 全长片段, 经中间载体 pEZZ18 将二者融合, 再用 *NotI* 和 *XbaI* 切取融合片段 *flt-1*-GST, 用和上述构建 Ad-*EF-1-flt-1* 腺病毒相同的方法构建 Ad-*EF-1-flt-1*-GST 腺病毒, 同样的方法转染 MGC803 细胞, 取 2 ml 转染上清, 与预先经 GST 单抗吸附的蛋白 A 珠子 (1 g/L, 4℃ 摇 3 h) 15 μl 4℃ 反应过夜, 珠子用 PBS 洗 3 遍, 重悬于 15 μl PBS, 用常规方法进行 10% SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析, 检测 Flt-1 蛋白。

2 结 果

2.1 *flt-1* 信号肽及胞外 I ~ IV 区的克隆及鉴定

以高保真的 Vent DNA 聚合酶扩增目的片段, 并与 pcDNA3-*EF-1* 重组后, 对经酶切鉴定阳性的克隆进行测序, 测序结果证明, 获得的 cDNA 序列与 *flt-1* 信号肽及胞外 I ~ IV 区 cDNA 序列完全一致。

2.2 重组腺病毒的构建及鉴定

按图 1 所示的流程构建重组腺病毒, 将重组腺病毒 Ad-*EF-1-flt-1* 转染的 293 包装细胞培养上清及细胞裂解上清用蛋白酶 K 处理后, 用 *flt-1* 特异引物进行 PCR, 同时将腺病毒 Ad-Track 的细胞裂解液同样处理作为阴性对照, 结果可见, 在转染 Ad-*EF-1-flt-1* 的细胞培养上清及细胞裂解上清中均有目的片段的扩增, 表明重组腺病毒 Ad-*EF-1-flt-1* 已包装成功 (图 2)。

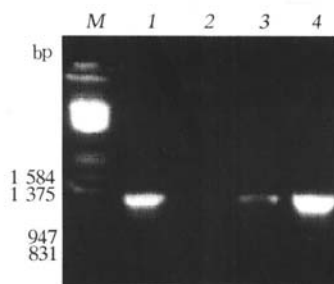


Fig. 2 Presence of recombinant adenovirus of Ad-*EF-1-flt-1* confirmed by PCR

M: ADNA/*HindIII*+*EcoRI* marker; 1: positive control; 2: virus supernatant of Ad-Track (negative control); 3: 293 cell culture medium of Ad-*EF-1-flt-1*; 4: virus supernatant of Ad-*EF-1-flt-1*.

2.3 重组腺病毒 Ad-*EF-1-flt-1* 高效感染 MGC803

重组病毒 Ad-*EF-1-flt-1* 以 $MOI = 50$ 感染 MGC803 细胞, 培养 20 h 后在荧光显微镜下观察 MGC803 细胞的感染效率, 结果可见几乎 100% 细胞均有病毒的感染 (图 3)。

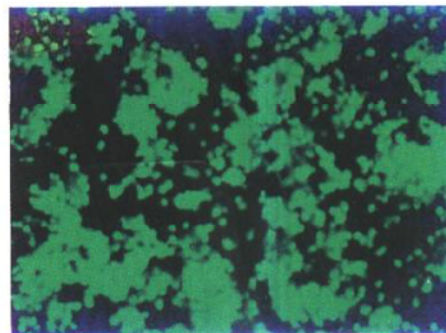


Fig. 3 MGC803 cell infected by recombinant adenovirus of Ad-*EF-1-flt-1* ($MOI = 50$) observed by fluorescence microscopy ($\times 100$).

2.4 RT-PCR 检测外源基因的转录

用 TRIZOL 试剂盒提取 Ad-*EF1-flt-1* 感染的 MGC803 细胞总 RNA, 经 DNase I 处理后进行 RT-PCR, 并用 RNA 直接 PCR 和 Ad-Track 感染 MGC803 的 RT-PCR 作为阴性对照. 结果可见, Ad-*EF1-flt-1* 感染的 MGC803 细胞有 *flt-1* cDNA 片段的扩增, 而阴性对照无特异条带产生, 表明导入的外源基因 *flt-1* 在 mRNA 水平能有效转录(图 4).

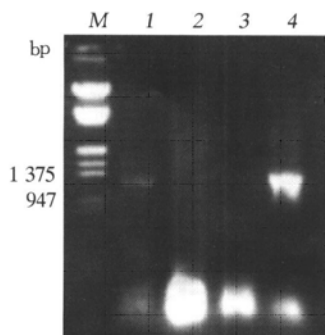


Fig. 4 RT-PCR analysis of *flt-1* gene transcription in MGC803 cells infected by Ad-*EF1-flt-1*

M: λ DNA/*Hind* III + *Eco*R I marker; 1: Ad-*EF1-flt-1* RT-PCR; 2: negative control (Ad-*EF1-flt-1* RNA PCR); 3: negative control (Ad-Track RT-PCR); 4: positive control.

2.5 免疫印迹和免疫沉淀检测 Flt-1 的表达和分泌

以 $MOI = 50$ 的 Ad-*EF1-flt-1* 感染 MGC803 肿

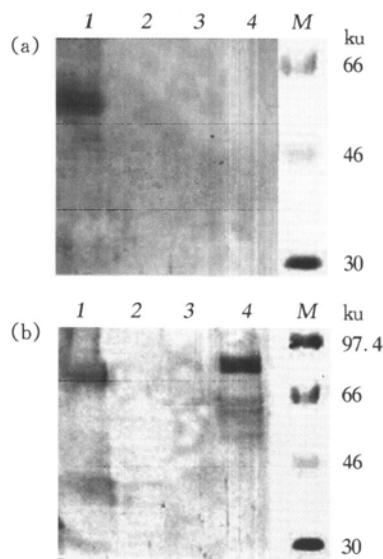


Fig. 5 Identification of the expression and secretion of Flt-1 in transfected cells with Western blot and immunoprecipitation (a) expression analysis of Ad-*EF1-flt-1* infected cells. 1: cell lysis of Ad-*EF1-flt-1*; 2: cell lysis of Ad-Track; 3: culture supernatant of Ad-*EF1-flt-1*; 4: culture supernatant of Ad-Track. (b) secretion analysis of Ad-*EF1-flt-1*-GST infected cells. 1: cell lysis of Ad-*EF1-flt-1*-GST; 2: negative control of cell lysis; 3: negative control of supernatant immunoprecipitation; 4: supernatant immunoprecipitated with mouse GST antibody.

瘤细胞, 收集细胞裂解液和培养上清, 用抗 Flt-1 兔多抗进行免疫印迹检测, 在细胞裂解液中约 55 ku 的位置有明显条带, 比根据核苷酸的数目进行的理论推算值 48 ku 略大, 可能与蛋白质的糖基化有关(图 5a). 对培养上清进行免疫印迹未见明显条带.

以 $MOI = 50$ 的 Ad-*EF1-flt-1*-GST 感染 MGC803 肿瘤细胞, 收集 72 h 后的培养上清, 取 2 ml 上清用抗 GST 抗体进行免疫沉淀, 用抗 Flt-1 兔多抗进行免疫印迹, 在约 80 ku 处有明显的条带, 由于单独 GST 分子质量为 26 ku, 故二者融合后的分子质量与单独 Flt-1 分子质量 (55 ku) 相吻合(图 5b).

3 讨 论

目前, 阻断肿瘤血管形成已经成为肿瘤治疗的新思路, VEGF 是重要的内皮细胞生长因子, 它通过与内皮细胞表面的高亲和力受体 Flt-1 和 KDR 的结合发挥作用.

Flt-1 与 KDR 均含有 7 个胞外免疫球蛋白样功能区, 属于 III 型酪氨酸激酶受体, 作为正向信号传导的受体, KDR 比 Flt-1 对内皮细胞的分化与增殖具有更重要的作用, Flt-1 仅对内皮细胞的排列及新生血管的组织装配起一定的作用^[4], 但是 Flt-1 与 VEGF 的结合不需要其他因子参与, 它同 VEGF 结合的亲和力比 KDR 高出数十倍, 体内自然存在的可溶性 sflt-1 编码基因与完整 flt-1 的 I ~ IV 胞外区编码基因完全一样, 故在体内它可能作为一种天然的负反馈调节因子起作用^[3].

在 flt-1 的胞外 7 个 Ig 样功能区中, II 区是 VEGF 的结合区, III 区对 II 区空间结构的维持起稳定作用, IV 区与受体的二聚体的形成有关^[5,6]. 由于 Flt-1 胞外结合区的确定, 我们选择性地克隆了 flt-1 的胞外 I ~ IV 区, 目的是将其导入肿瘤细胞内并表达分泌至细胞外, 阻断 VEGF 的血管形成作用.

在肿瘤的基因治疗研究中, 腺病毒载体是应用较多的一种病毒载体, 具有宿主范围广泛, 基因转移效率高, 体内基因表达效率高的优点. 目前制备重组腺病毒载体多采用细胞内同源重组的方法, 该方法成功率低, 费时费力, 实验周期长, 本研究中, 我们采用了细菌内同源重组的方法, 制备重组腺病毒载体, 该方法由 He 等^[7]首次报道, 由构建流程图可见(图 1), 其主要特点是: a. 借助细菌

内同源重组能力强的特点, 穿梭质粒与腺病毒基因组质粒之间的同源重组在细菌内完成, 从而从根本上克服了传统的细胞同源重组法成功率低的缺陷.

b. 经卡那霉素初筛, 再经酶切鉴定的同源重组体质粒 DNA 转染 293 细胞, 包装产生的重组体腺病毒可省却细胞内同源重组法必须进行的多轮费时费力的筛选工作, 此外, 由于腺病毒骨架中还含有报告基因 GFP, 使测定病毒滴度和病毒转染效率十分方便, 因此, 用这种方法制备重组腺病毒高效, 简便, 实验周期短. 在这一体系中, 经常遇到的困难是: 没有同源重组子产生或筛选同源重组子时的背景太高, 阳性率低. 我们经反复摸索, 对解决这一问题有以下体会: a. 腺病毒基因组质粒的完整性和超螺旋状态对于产生理想的重组非常重要. b. 为了降低筛选背景, 穿梭质粒在经 *Pme* I 酶切后, 经电泳分离, 回收, 纯化, 定量, 然后用 200 ng 回收产物与 100 ng 腺病毒基因组质粒进行电转化, 转化后室温放置 5~10 min, 然后直接涂盘, 这样操作与文献报道酶切后直接酚-氯仿抽提, 乙醇沉淀, 电转化后 37℃ 摇 20 min 的操作比较, 虽然长出的克隆数有所减少, 但是阳性率可达 80%, 大大减少了筛选的工作量.

利用制备的 Ad-EF-1-flt-1 转染 MGC803 肿瘤细胞, RT-PCR 检测阳性, 蛋白质印迹结果显示细胞裂解液中有目的蛋白表达, 但是可能因为培养上清中目的蛋白浓度较低, 直接蛋白质印迹检测没有发现相应条带. 由于 sFlt-1 分子质量与抗体重链位置相近, 所以用免疫沉淀方法检测上清中的 sFlt-1 有困难. 为了解决这一问题, 确实证明该体系构建的腺病毒可以分泌 Flt-1 至细胞外, 我们又另外构建了融合蛋白 Flt-1-GST 的腺病毒载体, 将 GST

基因融合到 Flt-1 的 3' 端, 其翻译调控和分泌机制都将和 Flt-1 一样, 这样 GST 便可作为蛋白质表达的标签, 用来检测 Flt-1 的表达和分泌. 由此对细胞培养上清利用抗 GST 抗体进行免疫沉淀, 继而用 Flt-1 的多抗进行蛋白质印迹检测, 在约 80 ku 处有特异条带, 由于 GST 的分子质量为 26 ku, 因此与前面单独 Flt-1 为 55 ku 的结果相吻合.

至此, 我们分别从 mRNA 和蛋白质水平证明了 Flt-1 的重组及表达, 并通过对上清的检测确证了 sFlt-1 的分泌, 为后续开展 flt-1 的基因治疗研究打下了基础.

参 考 文 献

- 1 Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, *et al.* Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 1994, **269** (43): 26988~26995
- 2 Richard L, Kendall R L, Guan W, *et al.* Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, Flt-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **226** (2): 324~328
- 3 Richard L, Kendall R L, Kenneth A T. Inhibition of vascular endothelial growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (22): 10705~10709
- 4 Feng G H, Rossant J, Gertsenstrin M. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 1995, **376** (6535): 66~70
- 5 Davis-Smyth T, Chen H, Park J. The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. *EMBO J*, 1996, **15** (18): 4919~4927
- 6 Wiesmann C, Fuh G, Christinger H W. Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell*, 1997, **91** (5): 695~704
- 7 He T C, Zhou S, Costa L T, *et al.* A simplified system for generating recombinant adenovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (5): 2509~2514

Gene Cloning of Secreted VEGF Receptor flt-1 (I ~ IV extracellular domain) and The Corresponding Recombinant Adenovirus Construction and Expression*

ZHANG Hua, SHOU Cheng-Chao**

(Peking University School of Oncology, Beijing Institute for Cancer Research, Beijing 100034, China)

Abstract The increasing data show that the soluble form of Flt-1 have the ability to block the biological activity of VEGF due to its high affinity to VEGF and formation of homologous and heterogenous dimer with transmembrane Flt-1 and KDR. The binding activity of Flt-1 focuses on its II and III extracellular domain. cDNA fragments encoding for signal peptide and flt-1 I ~ IV extracellular domain were amplified through

RT-PCR with a pair of specific primers from human umbilical vein endothelial cells. Then, the *sflt-1* gene was subcloned into pcDNA3-EF-1 vector, and the expression unit of EF-1-*flt-1* was subcloned into shuttle vector of pAdTrack-CMV, linearized pAdTrack-EF-1-*flt-1* was co-transformed into BJ5183 cells with adenoviral genomic plasmid of pAdEasy-1. The identified recombinant DNA was transfected into 293 cells to package adenovirus. From the supernatant and cell lysis, the presence of recombinant adenovirus was proved by PCR, and RT-PCR detection demonstrated the transcription of *flt-1* in MGC803 cells infected with AdTrack-EF-1-*flt-1*, and immunoprecipitation reveals that soluble Flt-1 can be secreted into the culture supernatant of infected MGC803 cells. These results indicated that tumor cells infected with the prepared recombinant adenovirus vector AdTrack-EF-1-*flt-1* can secrete soluble Flt-1, which will be further used for *in vivo* antiangiogenesis experiments.

Key words adenovirus, *flt-1*, homogenous recombination, expression

* This work was supported by grants from The National Science Foundation for Outstanding Young Scientists of China (39525021), Beijing Committee of Science and Technology, Beijing Laboratory of Cancer Molecular Biology.

** Corresponding author. Tel: 86-10-66160960, E-mail: cshou9@hotmail.com

Received: January 17, 2002 Accepted: March 28, 2002

欢迎订阅 欢迎供稿 欢迎发布广告

《遗传学报》、《遗传》杂志和《基因组蛋白质组与生物信息学报》是中国科学院遗传与发育生物学研究所与中国遗传学会主办、科学出版社出版的国家级学术期刊，中国自然科学核心期刊。凡遗传学、发育生物学、基因组学、蛋白质组学、生物信息学、生物芯片、细胞生物学、分子生物学、生物进化等方面的研究论文、技术与方法、综述均受欢迎。英文稿件优先发表。

《遗传学报》(ISSN 0379-4172, CN11-1914/R) 为月刊，邮发代号 2-819，2003 年订价 25 元，全年 300 元。

《遗传》(ISSN 0253-9772, CN11-1913/R) 为双月刊，邮发代号 2-810，2003 年订价 18 元，全年 108 元。

《基因组蛋白质组与生物信息学报》2003 年创刊，季刊，订价 25 元，全年 100 元。

上述刊物编辑部办理邮购，个人自费邮购 7 折优惠，免收邮费。

投稿及邮购地址：北京安定门外大屯路 917 大楼 中国科学院遗传所编辑室

负责人：李绍武 邮编：100101

电话/传真：010-64889348, E-mail: swli@genetics.ac.cn